

脑脊液细胞学迈-格-姬染色在隐球菌脑膜炎诊断中的价值

樊新红^{1,2} 冯国栋¹ 杨毅宁¹ 代文¹ 赵钢¹

1. 解放军第四军医大学西京医院神经内科,陕西省西安市 710032

2. 中国兵器工业 521 医院神经内科,陕西省西安市 710065

摘要:目的 探讨脑脊液细胞学迈-格-姬(MGG)染色在隐球菌脑膜炎诊断中的价值。方法 对笔者所在医院诊治的 48 例隐球菌脑膜炎患者脑脊液涂片墨汁染色、细胞学 MGG 染色检查结果及诊断进行分析。结果 48 例隐脑患者首次脑脊液常规墨汁染色发现隐球菌 33 例,首次检出率为 68.8%;MGG 染色发现 46 例,首次检出率为 95.8%。MGG 染色诊断隐球菌脑膜炎的敏感度高于墨汁染色,差别有统计学意义($P < 0.05$)。结论 脑脊液 MGG 染色检查对隐球菌的检出率可达 95.8%,且可在脑脊液细胞学检查时一次完成,无需特殊染色,可作为中枢神经系统感染患者常规脑脊液细胞学检查。

关键词:脑脊液;脑膜炎;隐球菌;迈-格-姬染色;墨汁染色;诊断

Diagnostic value of May-Grunwald-Giemsa staining of cerebrospinal fluid in patients with cryptococcal meningitis

FAN Xin-Hong; FENG Guo-Dong; YANG Yi-Ning; DAI Wen; ZHAO Gang. Department of Neurology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: ZHAO Gang, Email: zhaogang@fmmu.edu.cn

Abstract: Objective To evaluate the diagnostic value of May-Grunwald-Giemsa (MGG) staining of cerebrospinal fluid in patients with cryptococcal meningitis. **Methods** The cerebrospinal fluid smears of 48 patients with cryptococcal meningitis in Xijing Hospital were subjected to India ink staining and MGG staining to detect Cryptococcus, and the diagnostic values of ink staining and MGG staining were compared according to the detection results. **Results** The India ink test was positive in 33 (68.8%) of 48 patients, while the MGG staining was positive in 46 (95.8%) of the 48 patients. MGG staining was significantly more sensitive than ink staining for diagnosis of cryptococcal meningitis ($P < 0.005$). **Conclusions** MGG staining increases the Cryptococcus detection rate up to 95.8% and can be finished in one step without need for special staining. It can be used as a conventional means of cerebrospinal fluid cytology in patients with central nervous system infection.

Key words: cerebrospinal fluid; meningitis; cryptococcal; May-Grunwald-Giemsa staining; ink staining; diagnosis

新型隐球菌脑膜炎病程长,临床表现、脑脊液常规检查及影像学检查缺乏特异性,临床诊断困难,预后较差,即使是正规的治疗,病死率仍高达 20%~30%^[1]。因此为临床提供早期的诊断依据是减少漏诊、误诊,改善预后的关键。目前确诊主要依靠脑脊液中病原体检测。本文作者整理了近四年来我院确诊的隐球菌脑膜炎 48 例,分析脑脊液细胞学 MGG 染色在其诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 48 例,男 29 例,女 19 例,年龄 4~83 岁,平均 43.9 ± 20.3 岁,病程 4~365 d,全部病例均有头痛,21 例伴有发热,1 例病程中有抽搐发作。体检脑膜刺激征阳性者 4 例。有局灶脑神经功能缺损者 2 例,1 例为一侧外展神经麻痹,1 例同时损害视力和听力,1 例为肢体无力,2 例患者均有意识障碍。

收稿日期:2013-04-02;修回日期:2013-05-30

作者简介:樊新红(1978-),女,主治医师,在职硕士,主要从事中枢神经系统感染的研究。

通讯作者:赵钢(1960-),男,主任医师,博士生导师,主要从事中枢神经系统感染的研究。E-mail:zhaogang@fmmu.edu.cn。

所有病例均为我院住院或门诊病人,经脑脊液细胞学 MGG 染色、涂片墨汁染色和阿利新兰染色检查发现新型隐球菌而确诊,其中尚合并隐球菌肺炎 1 例,合并乙型病毒性肝炎 (HB) 1 例,合并丙型病毒性肝炎 1 例,合并获得性免疫缺陷病毒感染 (HIV) 1 例,合并 2 型糖尿病 1 例,合并系统性红斑狼疮 (SLE) 2 例,合并结缔组织病 2 例,同时合并 HIV、HB 的 1 例,合并甲状腺功能亢进症 1 例,合并带状疱疹 1 例,未合并其它免疫功能异常疾患者 32 例。

1.2 纳入标准

有发热、头痛等典型临床表现;脑脊液普通墨汁染色、细胞学 MGG 染色及阿利新兰染色中任何一种检查检出隐球菌确诊隐球菌脑膜炎,抗真菌治疗有效者纳入。

1.3 方法

1.3.1 涂片墨汁染色 取脑脊液 3 ~ 5 ml 置于普

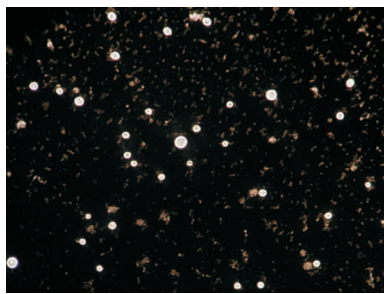


图 1 墨汁染色,可见透亮的圆形隐球菌。

1.4 统计学处理

所得数据经 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,计数资料采用卡方检验,检验水准取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑脊液常规、生化及细胞学

首次腰穿 44 例病人腰穿时脑脊液压力均不同程度升高,其中 6 例腰穿时脑脊液测压大于 300 mmH₂O。脑脊液外观无色透明。白细胞计数均有不同程度的增高。各病例首次脑脊液病理学检查结果:细胞学分类均呈混合细胞反应,淋巴细胞、激活型淋巴细胞、单核细胞及激活型单核细胞、嗜中性粒细胞各占一定比例,有时可见浆细胞及吞噬细胞,偶见嗜酸性粒细胞。其中 30 例呈淋巴细胞为主的混合细胞反应,小淋巴细胞加激活型淋巴细胞所占比例大于 50%,最高达 95.5%;5 例呈嗜中性粒细胞为主的混合反应,嗜中性粒细胞所

占比例大于 50%,最高达 81%;其余 13 例呈混合型,但单个核细胞均多于多个核细胞。

1.3.2 MGG 染色 取脑脊液 0.5 ml,采用粟式 FMU-6 玻片离心沉淀法收集细胞,细胞学 MGG 染色,在高倍镜下检测,光镜下可直接观察到隐球菌,呈大小不等、相隔距离基本相同的紫蓝色圆形菌体,有的可见圆形小芽孢从菌体长出,中心折光性较强,有的周围可见半弧形荚膜。多数呈簇排列,也有散在单个存在,见图 2。

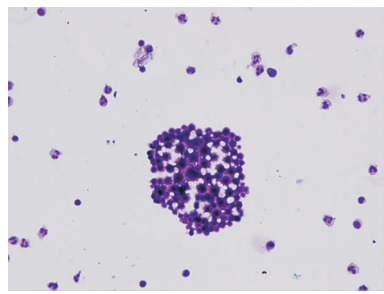


图 2 MGG 染色,可直接观察到隐球菌。

占比比例大于 50%,最高达 81%;其余 13 例呈混合型,但单个核细胞均多于多个核细胞。

2.2 隐球菌检测

48 例患者中,墨汁染色检出 33 例,灵敏度为 68.8% (95% 可信区间为 67.92% ~ 69.68%); MGG 染色检出 46 例,灵敏度为 95.8% (95% 可信区间为 95.64% ~ 95.97%)。数据表明, MGG 染色诊断隐脑的灵敏度高于墨汁染色,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

新型隐球菌性脑膜炎 (cryptococcus meningitis, CM) 是一种严重危害人类健康的深部真菌病。新型隐球菌的主要致病因子有荚膜和酚氧化酶。由于中枢神经系统封闭性高,机体免疫不易起作用;且代谢旺盛,葡萄糖含量低,可刺激酚氧化酶活性,同时有大量儿茶酚胺可作为酚氧化的底物,因此,新型隐球菌对中枢神经系统有高亲和性。

隐球菌性脑膜炎临床表现多变,脑脊液常规检查和头颅影像学检查缺乏特异性,容易漏诊或误诊为结核性脑膜炎^[2]。目前,脑脊液涂片墨汁染色查见或培养分离出隐球菌是隐球菌性脑膜炎诊断金标准,且墨汁染色操作简单迅速,隐球菌和背景差别较大,易于观察,特异性高,适合在基层医院推广^[3]。但由于隐球菌性脑膜炎脑脊液内菌量差异较大检出率低,文献报道新型隐球菌性脑膜炎脑脊液隐球菌检出率第1次为66%,第2次17.8%,其余需要3~20次涂片才能发现阳性^[4]。由于隐球菌性脑膜炎脑脊液细胞学和生化检查缺乏特异性,而单次墨汁染色阳性率太低,因此发展新型快速的隐球菌检测方法对提高隐球菌性脑膜炎诊断效率极为重要^[5]。

近年来,有多种血清学、免疫学以及PCR方法被用来诊断隐球菌性脑膜炎,但这些方法均费时费力,花费较高,不适合基层使用;且这些方法虽然敏感度较高,但是由于无法直接对隐球菌进行观察,因此无法排除假阳性的情况^[6,7]。脑脊液细胞学MGG染色是细胞学检查的常规手段,是一种简单易行的病理检查方法,MGG染色的隐球菌在光镜下有其独特的形态学特点,隐球菌呈团簇状分布,且能观察到典型的荚膜和毛刺结构,具有和脑脊液内免疫细胞迥然不同的结构,因此易于观察和分辨^[8]。本组病例中46例MGG首次染色即为阳性,阳性率为95.8%,说明此项检查是防止误诊的有效手段。对于初期及治疗后后期隐脑患者,脑脊液中隐球菌数量少,且多数隐球菌荚膜缺陷,墨汁染色不能检出,玻片离心沉淀法MGG染色却可以使极少量的隐球菌得到富集,极大提高了检出水平,对患者的早期治疗及维持期用药提供实验室证据^[9]。此外细胞学检查除检出隐球菌外,还可以看到单核吞噬细胞吞噬隐球菌,这对了解药物疗效起着重要参考作用。且标本存放时间较长,便于长期观察及治疗前后进行对照。

由此可见,脑脊液细胞学MGG染色检查采用玻片离心沉淀法收集标本检出隐球菌较传统的墨汁染色法采用试管离心法收集标本隐球菌阳性检出率更高,更直接,而且在细胞学检查时一步完成,无需特殊染色,是一种首选的快捷便利的方法,因此,对疑似新型隐球菌脑膜炎的病例除常规进行脑脊液涂片墨汁染色外,应将脑脊液MGG染色细胞学检查列为常规检查。由于MGG染色对检验人员的技术水平要求较高,当隐球菌散在出现时易与脑脊液中的小淋巴细胞相混淆,早期会忽视,

本组病例中就发现1例MGG染色阴性而墨汁染色阳性,因此,对疑似标本可在MGG染色的基础上再行印度墨汁染色予以确认。由于隐球菌荚膜内含有大量的酸性粘多糖,可被阿利新兰染液着色,所以阿利新兰染色对于隐球菌是特染,染色对比清晰,同时对其它炎性细胞不表达,特异性高。本组资料中有1例患者墨汁染色阴性,MGG染色阴性而经过阿利新兰染色检出了隐球菌而确诊。所以,对疑诊隐球菌脑膜炎患者在细胞学MGG染色及墨汁染色不能确定时可选择阿利新兰染色进一步验证,提高隐球菌的检出率,避免误诊或漏诊。

综上所述,MGG染色不仅方法便捷,耗时少,而且在诊断隐球菌性脑膜炎时敏感度更高,可以作为甚至替代墨汁染色成为隐球菌性脑膜炎的诊断的金标准。

参 考 文 献

- [1] Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*, 2004, 72: 99-118.
- [2] Taylor WR, Nguyen K, Nguyen D, et al. The spectrum of central nervous system infections in an adult referral hospital in Hanoi, Vietnam. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42099.
- [3] Satishchandra P, Mathew T, Gadre G, et al. Cryptococcal meningitis: clinical, diagnostic and therapeutic overviews. *Neurol India*, 2007, 55(3): 226-232.
- [4] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Di*, 2010, 50(3): 291-322.
- [5] Sato Y, Osabe S, Kuno H, et al. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci*, 1999, 164(1): 72-75.
- [6] Patel S, Shin GY, Wijewardana I, et al. The prevalence of cryptococcal antigenemia in newly diagnosed HIV patients in a Southwest London cohort. *J Infect*, 2013, 66(1): 75-79.
- [7] Saha DC, Xess I, Jain N. Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. *Indian J Med Res*, 2008, 127(5): 483-488.
- [8] Adam P, Sobek O, Dolezil D, et al. Cryptococcal meningitis—a follow-up study of a serious clinical entity: quick cytological and microbiological diagnostics using a special staining procedure in cerebrospinal fluid specimens. *Folia Microbiol (Praha)*, 2009, 54(6): 567-568.
- [9] Sugiura Y, Homma M, Yamamoto T. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 76(10): 1460-1461.